

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 14, 1976, pp. 185–188

Schutzeffekt von schwerem Wasser (D_2O) bei der Schädigung von Human-Erythrocyten durch thermische und osmotische Einflüsse

Von M. Wenzel

Biologisch-Chemische Abteilung, Pharmazeutisches Institut der Freien Universität Berlin

(Eingegangen am 12. August/3. Oktober 1975)

Zusammenfassung: Schweres Wasser schützt Human-Erythrocyten gegen Schäden durch Hyperthermie, Einfrieren und Hypotonie. Dies konnte durch verminderte Hämolyse von D_2O -haltigen Erythrocyten-Suspensionen gezeigt werden.

Der Stabilisierungseffekt nimmt bei geringen D_2O -Konzentrationen (5–20%) besonders stark zu. Mögliche Anwendungen dieses Prinzips werden diskutiert.

Protection of erythrocytes in D_2O against damage by hyperthermy and freezing

Summary: The haemolysis of erythrocytes after heating to 55°C, after freezing and after osmotic damage was studied in normal water and in heavy water (D_2O). Haemolysis in all cases was lower in the presence of D_2O . The greatest increase in stability was observed between 5–20% D_2O .

The practical consequences of this protective effect for the preservation of blood are discussed.

Einführung

Mit Ehrlich-Ascites-Tumorzellen als Modell konnten wir einen Schutzeffekt von schwerem Wasser (D_2O) gegen die Zell-Schädigung durch Hyperthermie nachweisen: Die DNA-Synthese in D_2O erhitzter Zellen war höher als nach Erhitzen (40–45°C) in normalem Wasser (1).

Ausgehend von diesem Befund schien es interessant, nach einem möglichen Schutzeffekt von schwerem Wasser gegen Zellschädigung bei menschlichen Zellen zu suchen. Im folgenden beschreiben wir die Stabilisierung von Human-Erythrocyten durch D_2O . Dabei erfaßte die hier von uns verwendete Methode nicht eine Stoffwechselleistung der Zellen, sondern die Stabilisierung der Erythrocyten-Membran.

Material und Methoden

Schweres Wasser (D_2O -Konzentration 99,7%) bezogen wir von der Fa. Merck, Sharp und Dohme (München).

Alle Inkubationen der Erythrocyten sowohl in H_2O als auch in D_2O wurden in physiologischer NaCl-Lösung (0,15 mol/l NaCl) ausgeführt. Nur bei den Versuchen zur osmotischen Schädigung (Abb. 1, teilweise Abb. 4) wurden andere Natriumchlorid-Konzentrationen verwendet. Nach Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert und im Überstand Hämoglobin als Hämiglobin-Cyanid nach l.c. (2) bestimmt.

Ergebnisse und Diskussion

Bei allen Untersuchungen mit Erythrocyten diente die Hämolyse als Maß für die Zellschädigung.

Wir prüften zunächst die osmotische Resistenz der Erythrocyten in H_2O und D_2O . Abbildung 1 zeigt die Hämolyse von Human-Erythrocyten in Abhängigkeit von der Natriumchlorid-Konzentration des Suspensions-Mediums. Danach wird in H_2O eine 50%ige Hämolyse bei einer NaCl-Konzentration von 4,3 g/l erreicht, was mit Literatur-Werten übereinstimmt (Übersicht in l.c. (3)). Bei Inkubation der Erythrocyten in 85%igem schwerem Wasser sind die Zellen dagegen merklich unempfindlicher: Erst bei einer NaCl-Konzentration von 3,8 g/l werden 50% aller Zellen hämolysiert.

Die Stabilisierung der Erythrocyten-Membran in D_2O läßt sich auch bei Schädigungen durch Hyperthermie oder Gefrieren nachweisen.

Abbildung 2 gibt das Ausmaß der Hämolyse einer 5%igen Zellsuspension nach Erhitzen auf verschiedene Temperaturen wieder: Während erwartungsgemäß im Bereich von 20–37°C sowohl in H_2O – als auch im D_2O -Medium der Anteil der hämolysierten Zellen sehr gering ist, steigt die Hämolyse beim Erhitzen auf Temperaturen über 38°C sowohl in H_2O als auch D_2O an. Im gesamten

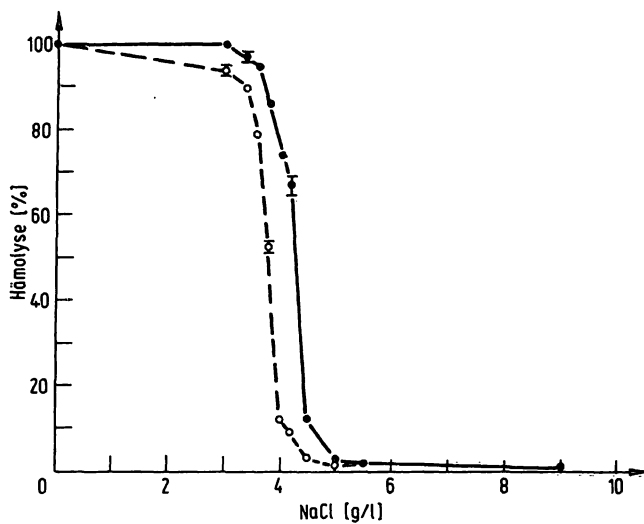


Abb. 1. Osmotische Resistenz von Erythrocyten in H_2O und D_2O . Eine 5%ige Zellsuspension in H_2O bzw. 85%igem D_2O mit der angegebenen NaCl-Konzentration wurde 20 min bei $20^\circ C$ inkubiert. Nach Abzentrifugieren wurde im Überstand der Hämoglobin-Gehalt bestimmt.

● — H_2O
○ — D_2O

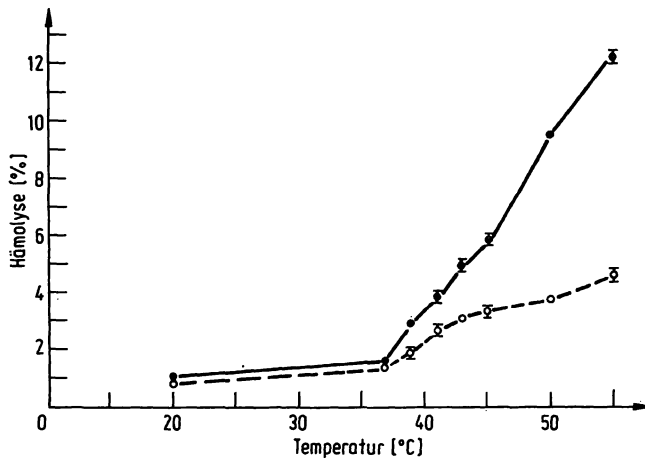


Abb. 2. Hämolyse von Erythrocyten nach Erhitzen auf verschiedene Temperaturen. Eine 5%ige Zellsuspension mit 9 g/l NaCl (in H_2O bzw. 85%igem D_2O) wurde 10 min auf die angegebenen Temperaturen erwärmt und anschließend im Überstand der Hämoglobin-Gehalt bestimmt.

● — H_2O
○ — D_2O

Temperatur-Bereich ist jedoch die Hämolyse in schwerem Wasser geringer, besonders bei höheren Temperaturen. Um den Schutzbereich gegen Hyperthermie-Schäden weiter zu charakterisieren, wurde bei $55^\circ C$ die Abhängigkeit der Hämolyse von der Erhitzungsdauer in den beiden Medien bestimmt (Abb. 3). Auch hier ist der Einfluß des schweren Wassers mit stärkerer Schädigung (Zeit der Hyperthermie) immer ausgeprägter. Bei einer Erhitzungsdauer von 50 min auf $55^\circ C$ beträgt in 85%-igem D_2O die Hämolyse nur 12% des Kontrollwertes.

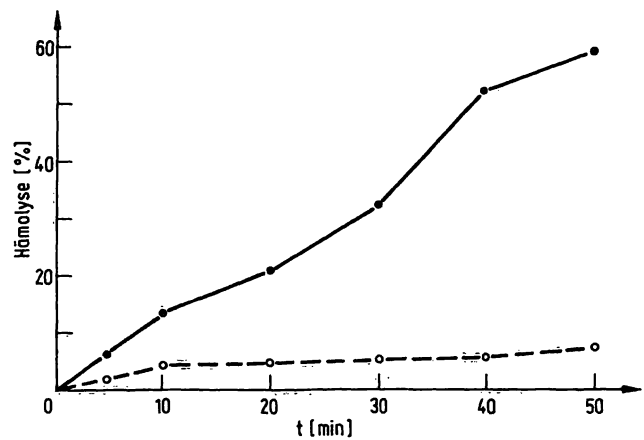


Abb. 3. Einfluß der Hyperthermie-Zeit auf die Hämolyse. Zellsuspensionen gemäß Abb. 2 wurden verschiedene Zeiten auf $55^\circ C$ erwärmt.

● — H_2O
○ — D_2O

Besonderes Interesse verdiente die Frage: Stabilisiert schweres Wasser Human-Erythrocyten auch gegen Schädigung durch Gefrieren? Entsprechende Versuchsergebnisse sind in Tabelle 1 wiedergegeben. Im Vergleich zu den Hyperthermie-Versuchen ist hier die stabilisierende Wirkung des D_2O nicht so groß. Die Hämolyse in D_2O geht maximal auf 17% des Wertes zurück, der in H_2O gefunden wird. Da aber in Tabelle 1 nur wenige Parameter geprüft wurden, läßt sich der Schutzeffekt wahrscheinlich durch andere Kombinationen noch erhöhen (4).

Alle bisher geschilderten Versuche wurden mit einer relativ hohen Konzentration von D_2O (85–90%) durchgeführt. Für eventuelle praktische Anwendungen des hier aufgezeigten Prinzips war die Frage wichtig: Sind bei wesentlich geringeren D_2O -Konzentrationen noch deutliche Stabilisierungseffekte nachweisbar?

Tab. 1. Unterschiedliche Hämolyse in H_2O bzw. D_2O bei Kälte-lagerung von Erythrocyten
5%ige Zellsuspension mit 9 g/l NaCl
* D_2O -Gehalt 20%.

	% Hämolyse bei verschiedenen Lagerungsbedingungen			
	5 Tage bei $0^\circ C$	5 min bei $-19^\circ C$	12 h bei $-196^\circ C$ Kühlgeschwindigkeit: 2,3°/min	
	ohne Zusatz	mit 150 g/l Glucose	ohne Zusatz	mit 10 ml/l Glycerin
H_2O	2,2	2,8	90,2	75,3
D_2O (85%)	0,38	1,2	69,6	59,1*
Hämo- lyse in D_2O / H_2O	0,17	0,43	0,77	0,79

Die Ergebnisse entsprechender Versuche sind in Abb. 4 dargestellt.

Um eine bessere Vergleichbarkeit trotz unterschiedlichem Ausmaß der Hämolyse zu erhalten, gibt die Ordinate den Schutzeffekt im D₂O-Medium entsprechend folgender Beziehung an:

$$\% = \frac{\text{Hämolyse in H}_2\text{O} - \text{Hämolyse in D}_2\text{O}}{\text{Hämolyse in H}_2\text{O}} \times 100$$

Die quantitativen Zusammenhänge lassen sich durch folgende Überlegungen klarmachen: Tritt in D₂O überhaupt keine Hämolyse auf, so ergibt sich ein Schutzeffekt von 100%. Ist die Hämolyse in D₂O genau so groß wie in H₂O, errechnet sich ein Schutzeffekt von 0%.

Erstaunlicherweise steigt bei allen drei untersuchten Schädigungsarten (Hyperthermie, Gefrieren und Hypotonie) der Schutzeffekt nicht linear mit der D₂O-Konzentration an. So erreicht gemäß Abbildung 4 der Schutzeffekt des schweren Wassers bereits bei geringen D₂O-Konzentrationen, z. B. in 20%igem D₂O etwa 1/2–3/4 des maximalen Wertes. Auch hier läßt sich wahrscheinlich durch Variation der einzelnen Parameter der Schutzeffekt noch verbessern.

Diskussion

Die in dieser Arbeit aufgezeigte stabilisierende Wirkung von schwerem Wasser auf Erythrocyten entspricht ähnlichen Effekten bei Proteinen oder anderen biologischen Objekten (5–8).

Die Stabilisierung von Proteinen gegen Hitzedenaturierung durch D₂O wird mit der 2-10-fach größeren Stabilität von Deuterium-Brücken im Vergleich zu Wasserstoff-Brücken erklärt (6, 9). Die gleiche Erklärung bietet sich auch für die Stabilisierung der Erythrocyten-Membran gegen Erhitzen in D₂O an. Möglicherweise trifft dies auch für die Einfrierversuche zu, obwohl hierbei mechanische Belastungen der Membran durch osmotische Effekte die entscheidende Schädigung darstellen. Auf jeden Fall schützt D₂O auch gegen osmotische Schäden, wie Abbildung 1 zeigt. Hierbei spielen wahrscheinlich kinetische Isotopie-Effekte nur eine untergeordnete Rolle (9–11).

Die Versuche zur Stabilisierung von Erythrocyten gegen Gefrieren zeigen – im Vergleich zu den Hyperthermie-Versuchen – nur einen relativ geringen Schutzeffekt des D₂O. Als Kryoprotektiva bekannte Substanzen haben teilweise eine stärkere Schutzwirkung (4, 12, 13). Dennoch erscheinen uns unsere Versuche erwähnenswert. Bisher bekannte Kryoprotektiva müssen nämlich in sehr hohen Konzentrationen (10–40%) der Erythrocyten-Suspension zugefügt werden, wenn sie einen deutlichen Schutzeffekt ausüben sollen. Werden diese Substanzen zur Stabilisierung von Blutkonserven angewendet, so müssen sie wieder entfernt werden, bevor die Erythrocyten dem Patienten appliziert werden können. Dies

wäre bei einer Stabilisierung von Erythrocyten mit D₂O nicht nötig.

Als ein wesentlicher Vorteil von D₂O ist die gleichzeitige Schutzwirkung gegen Hitze- und Kälte-Schäden anzusehen.

Besonders bedeutsam für eine mögliche praktische Verwendung von D₂O zur Stabilisierung von Zellen (8) scheinen uns die Befunde gemäß Abbildung 4. Man wird bei entsprechenden Anwendungen natürlich schon aus ökonomischen Gründen mit einem Minimum von D₂O arbeiten. Da bei allen hier geprüften Schädigungstypen bereits ein Anteil von 20% D₂O einen deutlichen Schutz ausübt, wäre eine toxische Wirkung bei möglicher Gabe entsprechender Blutkonserven auszuschließen. Die Applikation von 1 Liter Blut mit 20% D₂O führt nur zu einem D₂O-Gehalt im Menschen von etwa 0,5% (60% Körperwasser bei 70 kg Gewicht). Ein derart geringer D₂O-Gehalt im Organismus spielt praktisch keine Rolle. Bei jungen Mäusen war die Gewichtszunahme bei Tieren, die 25% D₂O im Trinkwasser erhielten, genau so groß oder besser als bei den Kontrolltieren (6). Sowohl Mäuse als auch Fische waren mit einem D₂O-Gehalt von 6% bzw. 25% monatelang lebensfähig (6, 14).

Weitere Versuche zur Stabilisierung anderer Zellen oder Gewebe sind im Gange.

Danksagung

Für geschickte technische Assistenz danke ich Frau Barbara Brüggener.

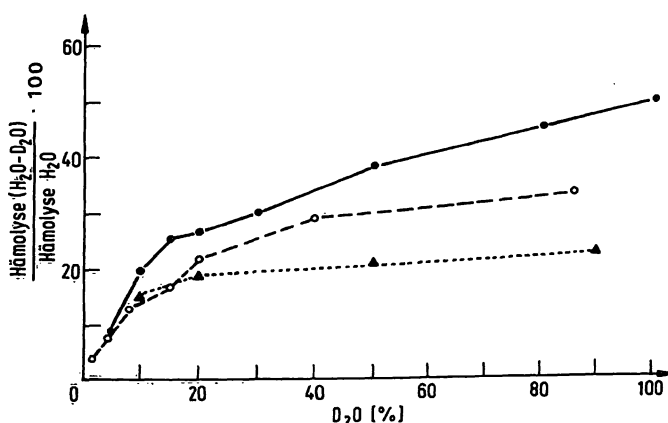


Abb. 4. Änderung des Schutzeffektes mit der D₂O-Konzentration bei Erythrocyten.

Obere Kurve: Hyperthermie 55°C, 40 min (vgl. Abb. 3)
mittlere Kurve: Hämolyse in 3,8 g/l NaCl, 20 min (vgl. Abb. 1)
untere Kurve: Hämolyse durch Gefrieren –196°C, 12 h Abkühlung: – 4,3°/min (sonstige Bedingungen vgl. Tab. 1).

Literatur

1. Wenzel, M. & Stöhr, W. (1970). Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, 737–740.
2. Richterich, R. (1971). „Klinische Chemie“ 3. Auflage, S. Karger, Basel–München–Paris–London.
3. Documenta Geigy „Wissenschaftliche Tabellen“, 7. Auflage (1969) S. 613.
4. Karow, A. M. (1969). J. Pharm. Pharmac. 21, 209–223.
5. Mayburg, R. H. & Katz, J. (1956). Nature 177, 629–630.
6. Thomson, J. F. (1963). „Biological Effects of Deuterium“ Pergamon Press, Oxford, London, New York, Paris.
7. Lehr, E., Werner, G. & Wenzel, M. (1974). Naturwissenschaften 61, 399–401.
8. Wenzel, M. (1972). DOS 2 253 086.
9. Simon, H. & Palm, D. (1966). Angew. Chem. 78, 993–1007.
10. Krumbiegel, P. & Serfas, O. (1966). Arch. Pharmazie 299, 432–440.
11. Krumbiegel, P. (1968). Z. Chemie 8, 328–333.
12. Meryman, H. T. (1968). Nature 218, 333–336.
13. Meryman, H. T. & Hornblower, M. (1972). Cryobiology 9, 262–267.
14. Lehr, E., Wenzel, M. & Werner, G. (1970). Naturwissenschaften 57, 521–524.

Prof. Dr. M. Wenzel
Fachbereich Pharmazie
Königin-Luise-Str. 2–4
D-1000 Berlin 33